

ANAIIS

29 de Novembro a 02 de Dezembro de 2010

VI Congresso Brasileiro

de **Microbiologia**

BRASÍLIA – DF

Local: Edifício FINATEC – Campus Universitário Darcy Ribeiro-UnB

Realização:



Apoio:



ANais

VI CONGRESSO BRASILEIRO DE MICOLOGIA

Brasília, 29 de novembro a 02 de dezembro de 2010

Editores: José Carmine Dianese

Leila Terezinha Pereira dos Santos

Capa: Ponte JK –Brasília- DF

Layout: Leila Terezinha Pereira Dos Santos

Foto: Carlos Antonio Inácio

SOCIEDADE BRASILEIRA de MICOLOGIA

(SBMy)

- -Houterman, P.M., Speijer, D., Dekker, H.L., de Koster C.G., Cornelissen, B.J.C., Takken, F.L.W., and Rep, M. 2007. The mixed sap proteome of *Fusarium oxysporum*-infected tomato plants. *Mol. Plant Pathol.* 8:215-221.
- -Houterman, P.M., Ma L., van Ooijen, G., de Vroomen, M.J., Cornelissen, B.J.C., Takken, F.L.W., and Rep, M. 2009. The effector protein Avr2 of the xylem-colonizing fungus *Fusarium oxysporum* activates the tomato resistance protein I-2 intracellularly. *Plant J.* 58:970-978.
- -Kellis, M., Patterson, N., Endrizzi, M., Birren, B. and Lander, E. S. 2003. Sequencing and comparison of yeast species to identify genes and regulatory elements. *Nature* 423:241-254.
- -Lievens, B., Houterman, P., and Rep, M. 2009. Effector gene screening allows unambiguous identification of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* races and discrimination from other formae speciales. *FEMS Microbiol. Lett.* 300:201-215.
- -Ma, L.-J., van der Does, H.C., Borkovich, K.A., Coleman, J.J., Daboussi, M.-J., Di Pietro, A. 2010. Comparative genomics reveals mobile pathogenicity chromosomes in *Fusarium*. *Nature* 464: 367-373.
- -O'Donnell, K., Sutton, D.A., Rinaldi, M.G., Magnon, K.C., Cox, P.A., Revankar, S.G. et al. 2004. Genetic diversity of human pathogenic members of the *Fusarium oxysporum* complex inferred from multilocus DNA sequence data and amplified fragment length polymorphism analyses: evidence for the recent dispersion of a geographically widespread clonal lineage and nosocomial origin *J. Clin. Microbiol.* 42:5109-5120.
- -Rep., M., van der Does, H.C., Meijer, M., van Wijk, R., Houterman, P.M., Dekker, H.L., de Koster, C.G., and Cornelissen, B.J.C 2004. A small, cysteine-rich protein secreted by *Fusarium oxysporum* during colonization of xylem vessels is required for I-3-mediated resistance in tomato. *Mol. Microbiol.* 53:1373-1383.
- -Metzker, M. L., 2009 Sequencing technologies - the next generation. *Nature Review Genetics* 11:31- 46.
- -Rep., M, and Kistler, H. C. 2010. The genomic organization of plant pathogenicity in *Fusarium* species. *Current Opinion in Plant Biology* 13:420-426.

P012

A Identificação de Fungos pela Espectrometria de Massa Através da Técnica de MALDI-TOF ICMS. Santos C, Lima NMVS. IBB - Centro de Engenharia Biológica, Universidade do Minho,, Braga,. cledir.santos@deb.uminho.pt. [Identification of Fungi Using a Mass Spectrometric MALDI-TOF GST Technique]

O sistema mais antigo para a classificação das espécies de fungos, que incluem fungos filamentosos e leveduras, são baseados em dados morfológicos, principalmente aqueles ligados às estruturas reprodutivas. No entanto, este método de classificação apresenta limitações críticas, tais como as culturas de fungos que não desenvolvem estruturas reprodutivas, ou a semelhança morfológica entre membros de espécies diferentes (Santos et al. 1998). A incorporação de testes bioquímicos e moleculares em taxonomia de fungos tem ajudado a resolver esses problemas, pelo menos na generalidade dos casos (Correia et al. 2006; Rodrigues et al. 2009). Apesar destes avanços, as principais limitações situam-se por (1) os testes fisiológicos rápidos e

fiáveis e os dados das sequências estarem disponíveis ainda apenas para um número limitado de taxa; (2) a aplicação de métodos moleculares à rotina é relativamente cara e exige equipamento e mão-de-obra altamente especializados; (3) apresentam atrasos na identificação (que em alguns casos podem ser de semanas) bem como limitações na discriminação de espécies relacionadas.

Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation - Time Of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) é uma técnica físico-química robusta para a análise de moléculas orgânicas. Esta técnica tem sido usada como uma abordagem fenotípica para a identificação rápida de fungos (Santos et al. 2010a). Neste caso, o interesse da técnica em questão é a análise das células intactas, onde o espectro gerado é interpretado como um fingerprint celular. Esta abordagem é designada por MALDI-TOF IC (Intact Cell) MS. Esta técnica tem dado um grande contributo para o conhecimento científico a cerca da identificação desse grupo de microrganismos e já tem sido utilizada como uma ferramenta eficaz para testes rápidos de análises clínicas, alimentar e ambiental (Lima et al. 2008, Pereira et al. 2010, Dias et al. 2010). A técnica de MALDI-TOF ICMS, quando aplicada à identificação de fungos, está fundamentada principalmente na análise das proteínas ribossomais. Além destas proteínas, as proteínas constituintes das paredes do micélio e/ou esporos, no caso dos fungos filamentosos, e das paredes celulares, no caso das leveduras, também são de grande relevância neste processo de identificação. Assim, o espectro de massa das proteínas é gerado e interpretado como um fingerprint celular, onde apenas é importante a presença ou ausência dos picos referentes às proteínas. Em contraste, as intensidades dos picos (concentrações) não são relevantes no processo de identificação.

Os espectros obtidos nesta abordagem são comparados com espectros de referências existentes em bases de dados. Os agrupamentos entre esses espectros são baseados em dados estatísticos, tais como Análises de Componentes Principais (ACP) (Santos et al. 2010a).

Fundamentos da Técnica de MALDI-TOF ICMS

Matriz

Os fundamentos da técnica de MALDI-TOF são a desabsorção/ ionização de moléculas orgânicas intermediadas por uma matriz química. A desabsorção/ionização ocorre pela incidência de um feixe de um laser, que opera em um determinado comprimento de onda, sobre a mistura matriz/analito (Figura 1).

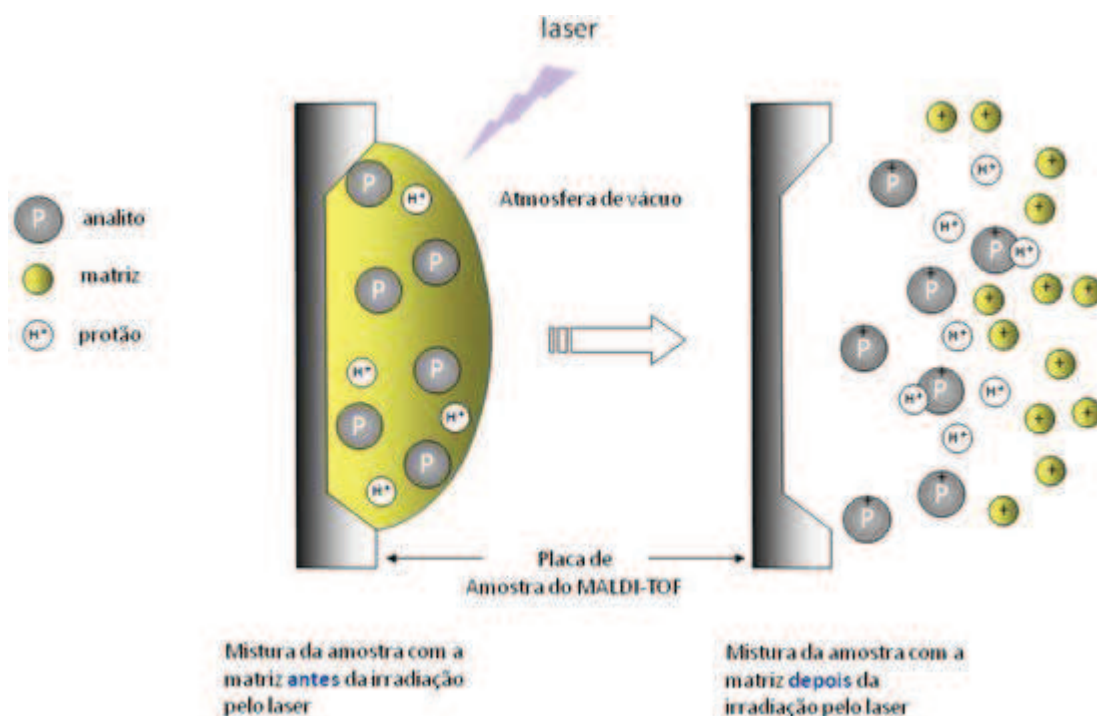
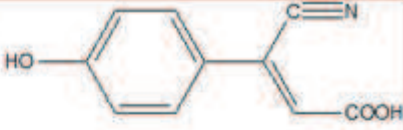
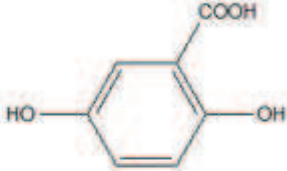
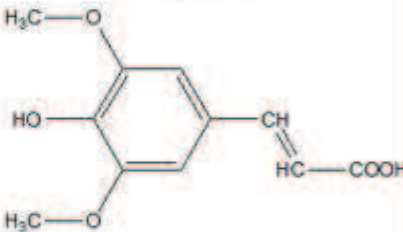
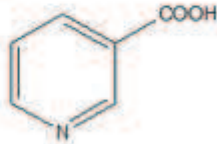
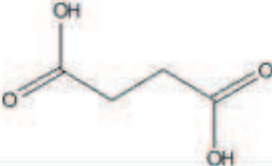


Figura 1: Processo de desabsorção/ionização por MALDI-TOF através da incidência de um laser sobre o material a ser analisado. A matriz é um composto orgânico capaz de absorver radiação na região do espectro onde o laser opera. Esse composto é usado em solução líquida denominada "solução matriz". O ácido 2,5-di-hidróxi-benzóico (DHB) ou o ácido α -ciano-4-hidroxi-cinâmico (CHCA) são exemplos de matrizes muito comumente empregadas na análise de fungos por MALDI-TOF ICMS. Na Tabela 1 são apresentadas as principais matrizes e os respectivos comprimentos de onda onde estas absorvem energia.

Na análise por MALDI-TOF a relação molar matriz/analito deve estar compreendida entre 100:1 e 50000:1, de modo a garantir o excesso da matriz em relação ao analito (Hillenkamp e Karas 1991). O excesso da matriz conduzirá a um processo de cristalização acentuado da amostra, o que fará com que o analito seja incorporado pela matriz. A amostra final quando submetida ao laser sofrerá uma ionização suave e eficiente, evitando a degradação das proteínas que serão usadas, no processo de identificação, como biomarcadores.

Tabela 1: Principais matrizes usadas na técnica de MALDI-TOF MS. As matrizes com absorção na zona do UV são as mais comumente empregadas na análise de fungos, em especial DHB e CHCA.

Nome	Código	Comprimento de onda	MM	Estrutura Química
Ácido α-ciano-4-hidroxi-cinâmico	CHCA	UV 337 nm 353 nm	189.1675	
Ácido 2,5-di-hidroxi-benzóico	DHB	UV 337 nm 353 nm	154.1201	
Ácido sinapínico	SA	UV 337 nm 353 nm	224.2100	
Ácido nicotínico	NA	UV 266 nm	123.1094	
Ácido succínico	SCA	IR 2.94 μm 2.79 μm	118.0266	

Laser - Os lasers mais comumente usados na técnica de MALDI-TOF operam numa região do espectro da luz que varia do ultravioleta ao infravermelho. Estes lasers podem ser gasosos ou sólidos e apenas são úteis à técnica de MALDI-TOF aqueles que operam em modo pulsado. Os lasers pulsados apresentam uma largura do pulso que varia em função do comprimento de onda em que actuam. No caso dos lasers que operam na faixa do ultravioleta, a largura do pulso pode estender-se de 0,5 a 20 ns. Já para os lasers que operam na faixa do infravermelho, a largura do pulso chega a ultrapassar os 200 ns (Dreisewerd et al. 1996).

Actualmente existem diversas marcas de equipamentos disponíveis que operam com diferentes lasers (Hillenkamp e Peter-Katalinic 2007). Na Figura 2 são apresentados os principais lasers disponíveis nos mais variados equipamentos de MALDI-TOF existentes no mercado. Na análise de fungos por MALDI-TOF os equipamentos mais usados são aqueles que operam com um laser de azoto (N₂). É necessário pois, que os espectros de massa contidos na base de dados usada para a identificação dos fungos sejam baseados nessa região do espectro da luz e, por isso, sejam compatíveis com as matrizes usadas nesses equipamentos.

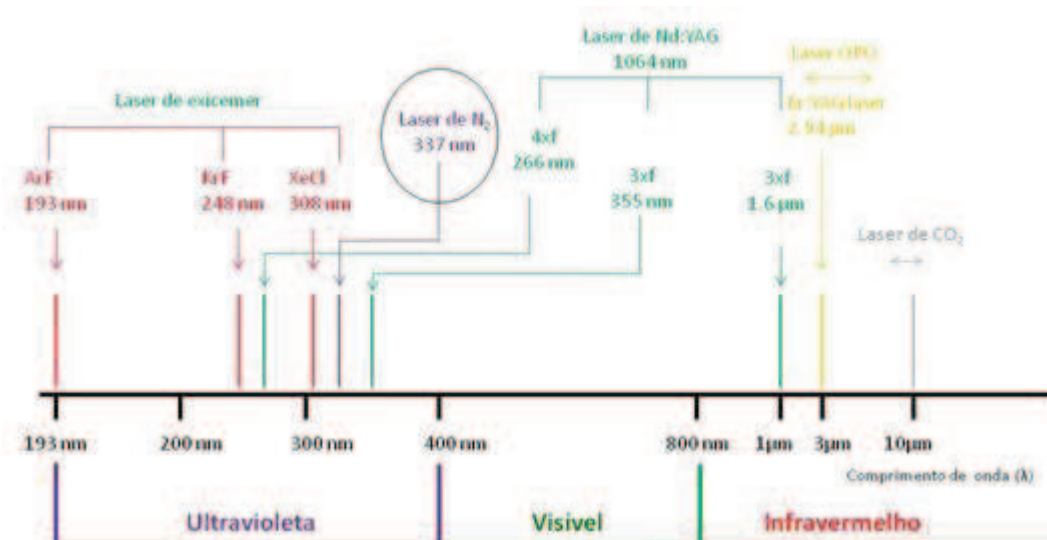


Figura 2: Principais lasers usados nas diferentes marcas e modelos de equipamentos de MALDI-TOF MS. O laser de azoto é um dos mais comumente usados na análise de fungos.

O laser de azoto opera num comprimento de onda de 337 nm, com um pulso da energia de 170 mJ e com uma largura do pulso inferior a 3.5 ns. As vantagens de usar este tipo de laser são o seu baixo custo, o tamanho reduzido da caixa que o suporta, a simplicidade técnica na momento da substituição e o facto de este laser emitir uma radiação num comprimento de onda próximo do máximo da absorção da radiação das matrizes mais usadas. Separação do iões

Quando o laser incide sobre a mistura matriz/analito gera uma explosão. Num passo inicial, a energia do laser incide quase que quantitativamente sobre a matriz, dado esta estar presente em excesso molar na amostra. Essa energia recebida pela matriz é transferida, num processo de desabsorção, para as moléculas do analito, que são assim ionizadas. Do impacto da explosão as moléculas ionizadas são alinhadas, dentro de uma zona submetida a um campo magnético d, de acordo com a razão massa/carga (m/z). Em função dessa razão m/z esses iões são direccionados para uma zona isenta de campo magnético, chamada "tubo de tempo de voo" ou "zona de deriva", onde são separados apenas em função das massas moleculares individuais (Pasch e Schrepp, 2003) (Figura 3).

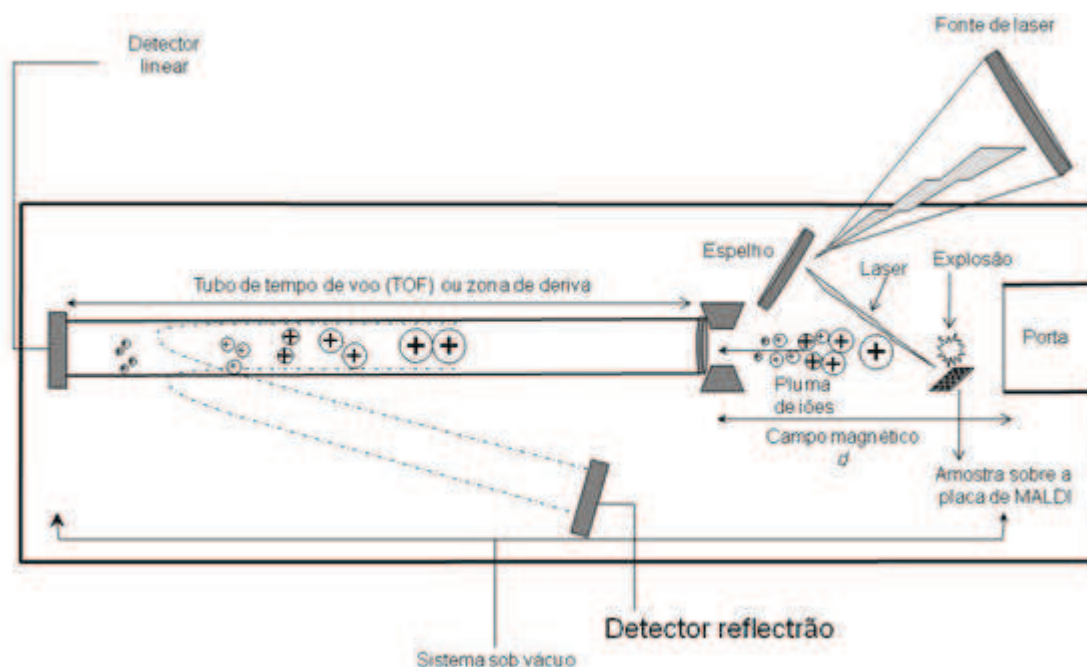


Figura 3: Modo genérico de funcionamento de um equipamento de MALDI-TOF MS. Depois da ionização a separação dos íons ocorre dentro da zona de deriva apenas em função das suas massas moleculares.

Na análise de fungos por MALDI-TOF ICMS as moléculas dos analitos (proteínas ribossomais e estruturais) têm massas moleculares que variam entre 2000 e 20000 Da. Por isso, para a separação dessas moléculas apenas é necessário a utilização do modo linear do equipamento. Neste caso, o modo linear tem comprimento suficiente para separar estas moléculas e gerar espectros sem ruídos. Calibração Externa A calibração externa é realizada antes do início da análise das amostras de fungos. Utilizam-se células intactas de *Escherichia coli* DH5 α e as proteínas 4365,4; 5096,8; 5381,4; 6241,4; 6255,4; 6316,2; 6411,6; 6856,1; 7158,8; 7274,5; 7872,1; 9742,0 e 12227,3 Da são usadas como calibrantes do fingerprint proteico.

Obtenção dos Espectros

Os espectros finais são tratados numa base de dados contendo espectros teóricos e experimentais para as diferentes espécies de fungos, onde apenas será levado em consideração a presença ou ausência dos picos referentes às proteínas disponíveis, como já referido anteriormente.

Preparação de Amostras

Na análise de fungos por MALDI-TOF ICMS uma pequena quantidade da amostra do material biológico - cerca de 50 μ g de biomassa (micélio, esporos, ou uma mistura desses dois materiais, ou células, no caso das leveduras) - é transferida directamente da placa de cultura para a placa de MALDI-TOF e recoberta por uma matriz orgânica em solução aquosa e acidificada. A acidez desta solução é fundamental para uma extracção proteica óptima e posterior ionização. Depois de evaporada a fase líquida, obtém-se uma amostra cristalizada, com características rugosas, necessária à ionização das moléculas. As amostras são, então, submetidas a um sistema de vácuo

e irradiadas por um laser pulsado, como já descrito. A Figura 4 apresenta os passos acima descritos para a preparação de amostras de fungos para a análise por MALDI-TOF ICMS.

No caso de amostras patogénicas, entre os passos 1 e 2 deve-se proceder a inactivação do material biológico, em câmara de fluxo laminar, com solução aquosa de ácido trifluoroacético 20%.

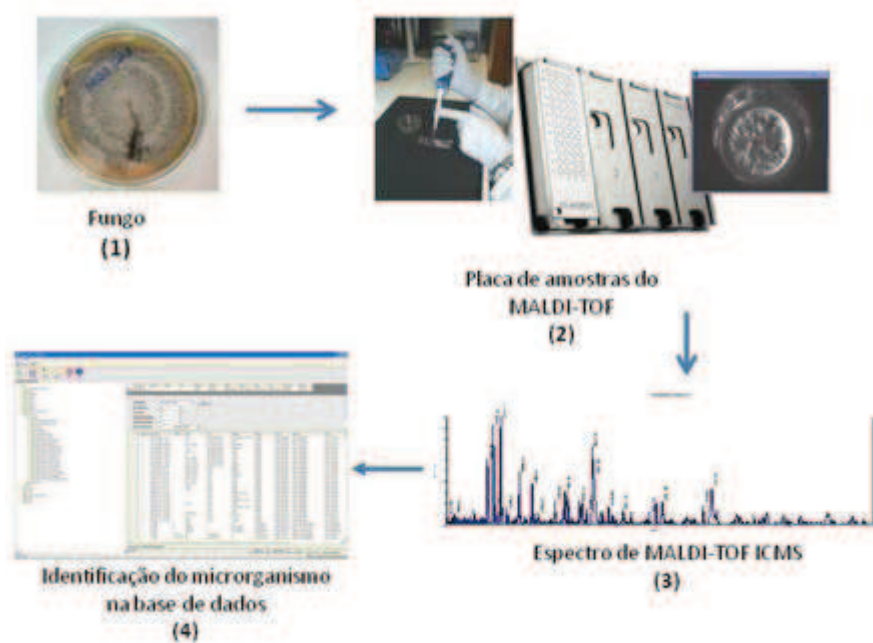


Figura 4: Passos para a preparação das amostras de fungos para análise por MALDI-TOF ICMS. 1) Isolamento e crescimento do material biológico em meio de cultura; 2) Transferência directa do material biológico isolado e crescido em meio de cultura para a placa de amostras do MALDI-TOF, adição da solução matriz sobre este material; secagem das amostras à temperatura ambiente e transferência das placas para medição no equipamento de MALDI-TOF; 3) Obtenção e edição dos espectros; 4) Identificação/armazenamento dos dados, buscas e comparações de rotina na base de dados e obtenção dos dendrogramas com as identificações. Estudos de Caso

A Figura 5 esquematiza os vários passos que constituem o método de identificação polifásica estabelecida pela Micoteca da Universidade do Minho para a identificação de fungos filamentosos.

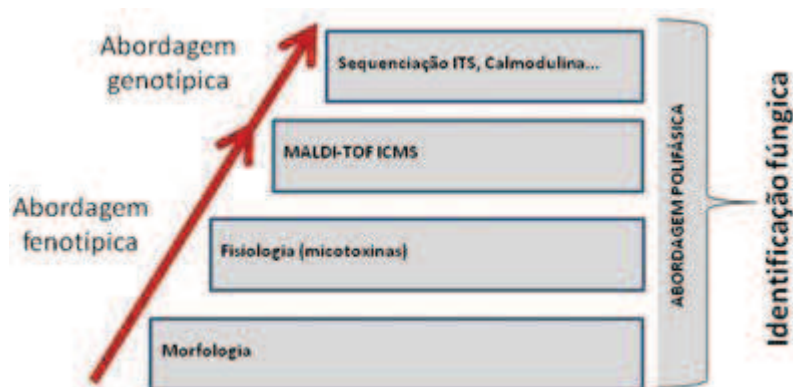


Figura 5: Passos para a identificação polifásica de fungos filamentosos.

De forma a ilustrar as potencialidades da técnica de MALDI-TOF ICMS nesta palestra será apresentada a identificação de fungos filamentosos do género *Aspergillus* secções *Nigri* e *Flavi* em conjugação com os outros métodos que constituem a nossa abordagem polifásica. Conclusões

A técnica de MALDI-TOF ICMS é bastante robusta na identificação de fungos até ao nível de espécie. Contudo, em alguns casos, é possível a diferenciação desses microrganismos até ao nível de estirpe. Esta técnica tem-se mostrado como sendo de grande relevância para a investigação nas diferentes vertentes da micologia. Adicionalmente, trata-se de uma técnica simples, económica, rápida (entre 10 segundos e 2 min/amostra) e de elevada eficácia. Mas é de fundamental importância ter em consideração que a técnica de MALDI-TOF ICMS é uma abordagem entre muitas e deve, por isso, ser usada como uma ferramenta de apoio dentro de uma abordagem polifásica no processo de identificação fúngica.

A Micoteca da Universidade do Minho tem, por isso, trabalhado numa abordagem polifásica onde são usadas a análise morfológica clássica, os perfis bioquímicos (metabolitos secundários), os dados espectrais (MALDI-TOF ICMS e FT-NIR - Fourier Transform-Near Infrared (Santos et al. 2010b)) e os dados moleculares (ITS, calmodulina, β -tubulina, etc.), de modo a reduzir ao máximo identificações incorrectas dos fungos.

Referências

- Correia, A., Sampaio, P., James, S., Pais, C. (2006) *Candida bracarensis* sp. nov., a novel anamorphic yeast species phenotypically similar to *Candida glabrata*. Int J Syst Evol Microbiol 56, 313-317.
- Dias, N., Santos, C., Portela, M, Lima, N. (2010) Toenail onychomycosis in a Portuguese geriatric population. (submetido).
- Dreisewerd, K., Shtirenberg, M., Karas, M., Hillenkamp, F. (1996) Matrix-assisted laser desorption/ionization with nitrogen lasers of different pulse widths. Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes. 154, 171-178.
- Lima, N., Rodrigues, P., Soares, C., Santos, C., Paterson, R., Venâncio, A. (2008) Modern Polyphasic Methods that Include MALDI-TOF Analyses for Fungal

Identifications and Authentications. European Culture Collections' Organization Meeting XXVII (ECCO XXVII), p. 11, 10th - 11th June, Ghent, Belgium.

- Hillenkamp, F., Peter-Katalinic, J. (Eds) (2007) MALDI MS: A Practical Guide to Instrumentation, Methods and Applications. Wiley-VCH, Hardcover, 362 pp.
- Hillenkamp, F., Karas, M. (1991). Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry of Biopolymers. Anal. Chem. 63, 1193-1203.
- Santos, I.M., Venâncio, A., Lima, N. (1998) Fungos Contaminantes na Indústria Alimentar. Micoteca da Universidade do Minho, Braga, 128 pp.
- Pasch, H., Schrepp, W. (2003) MALDI-TOF Mass Spectrometry of Synthetic Polymers. Springer-Verlag, Hardcover, 298 pp.
- Pereira L., Dias, N., Santos, C., Lima, N. (2010) MALDI-TOF ICMS: Capability, Potentiality and Limits in the Fast Identification of *Trichophyton Rubrum* from Clinical Cases Occurrence in Portuguese Health Centres, Clinical Microbiology and Infection, 16, S2, p. S530, P1795. Vienna, Austria.
- Rodrigues, P., Venâncio, A., Kozakiewicz, Z., Lima, N. (2009) A polyphasic approach to the identification of aflatoxigenic and non-aflatoxigenic strains of *Aspergillus* Section Flavi isolated from Portuguese almonds. Int. J. Food Microbiol. 129, 187-193.
- Santos, C., Paterson, R.M.R., Venâncio, A., Lima, N. (2010a) Filamentous fungal characterisations by matrix-assisted laser desorption/ionisation time of flight mass spectrometry. Journal of Applied Microbiology 108, 375-385
- Santos, C., Fraga, M.E., Kozakiewicz, Z., Lima, N. (2010b) Fourier transform infrared as a powerful technique for the identification and characterisation of filamentous fungi and yeasts. Research in Microbiology 161, 168-175.

P013

Fungal Nanotechnology. Fernandes S, Lima N, Santos C. Universidade do Minho, Campus de Gualtar, Portugal, Braga. sara.fernandes@deb.uminho.pt. [Fungal Nanotechnology]

Abstract:

Due to the outbreak of infectious diseases caused by different pathogenic microorganisms and the development of drug resistance, nanoscale materials have emerged up as novel antimicrobial agents and the well known activity of silver ions and silver-based compounds has promoted research in this field. For this reason, there is an essential need to develop environmentally benign procedures for synthesis of silver nanoparticles for commercialization purposes. In this study, silver nanoparticles were synthesised extracellularly from silver nitrate using the fungi supplied by Micoteca da Universidade do Minho (MUM) fungal culture collection, and the morphology of the nanoparticles was characterised. The potential to manipulate key parameters, which control growth and other cellular activities, to achieve an optimised production of nanoparticles were also investigated. In addition, a preliminary study was performed to assess the anti-fungal silver nanoparticles activity against bacteria. Introduction

The ability to uncover the structure and function of biosystems at the nanoscale, stimulates research leading to improvement in biology, biotechnology, medicine and healthcare. The integration of nanomaterials with biology has led to the development of diagnostic devices, analytical tools, physical therapy applications, and drug delivery vehicles (Chan, 2006). The importance of bactericidal nanomaterials study due to the increase in new resistant strains of bacteria and fungi against most potent antibiotics has promoted research in the well known activity of silver ions and silver-based compounds, including silver nanoparticles (Monteiro et al., 2009).

The different size and shape of nanomaterials can be synthesized by conventional chemical methods, but most of them are regarded as highly environmental cost. Generally, the chemical methods are low-cost for high volume; however, their drawbacks include contamination from precursor chemicals, use of toxic solvents, and generation of hazardous by-products (Tien et al., 2008). To accomplish the development of a reliable and ecofriendly process for synthesis of metallic nanoparticles, the use of natural sources like biological systems becomes essential. A vast array of biological resources available in nature including plants and plant products, algae, fungi, yeasts, bacteria, and viruses could all be employed for synthesis of nanoparticles (Mandal et al., 2006).

Importantly, for commercialization purposes, it would be advantageous to have a nonpathogenic biological system that produces the metallic nanoparticles. In relation to other microorganisms fungi present key characteristics such as tolerance and metal bioaccumulation abilities that are advantageous for production of nanoparticles (Mandal et al., 2006). Another advantage of using fungi in nanoparticle synthesis is the ease in their scale-up. Given that fungi are extremely efficient secretors of extracellular enzymes, it is thus possible to easily obtain large-scale production of enzymes (van den Hondel et al., 1992).

Hence, the present study was undertaken to prove the potential in extra-cellular biosynthesis of silver nanoparticles by different fungi supplied by Micoteca da Universidade do Minho (MUM, www.micoteca.deb.uminho.pt) fungal culture collection and investigate the antimicrobial effect in *E. coli*. Materials and Methods

Microorganisms

The fungi *Aspergillus oryzae* MUM 97.19 and *Penicillium chrysogenum* MUM 03.22 were obtained from Micoteca da Universidade do Minho fungal culture collection and maintained in potato dextrose agar plates at 25 oC. The bactericidal experiments were carried out with gram negative bacteria *Escherichia coli* that was sub-cultured in LB agar medium. Synthesis of silver nanoparticles

To prepare the biomass for biosynthesis studies the fungus was grown aerobically in MYGP liquid medium. The culture flask was incubated in an orbital shaker at 30 oC and agitated at 150 rpm. After 72 h of growth the biomass was harvested followed by extensive washing with sterile double distilled water to remove any medium components from the biomass. Typically 10 g (wet weight) was brought into contact with 100 mL sterile MiliQ water for 72 h at 30 oC in an Erlenmeyer flask and agitated as described earlier. After the incubation the cell filtrate was obtained by passing it through Whatman